

Erfolgspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978 *

⑫ PATENTSCHRIFT A5

640 246

⑪

②1 Gesuchsnummer: 1247/79

⑦3 Inhaber:
Farmitalia Carlo Erba S.p.A., Milano (IT)

②2 Anmeldungsdatum: 08.02.1979

⑦2 Erfinder:
Giuseppe Cassinelli, Voghera/Pavia (IT)
Arpad Grein, Milano (IT)
Sergio Merli, Bernareggio/Milano (IT)
Giovanni Rivola, Milano (IT)

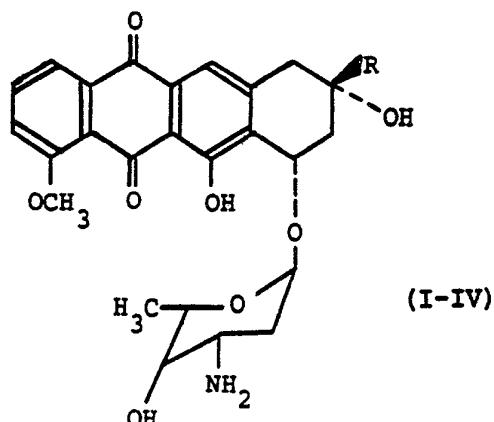
②4 Patent erteilt: 30.12.1983

⑦4 Vertreter:
Bovard AG, Bern 25

④5 Patentschrift
veröffentlicht: 30.12.1983

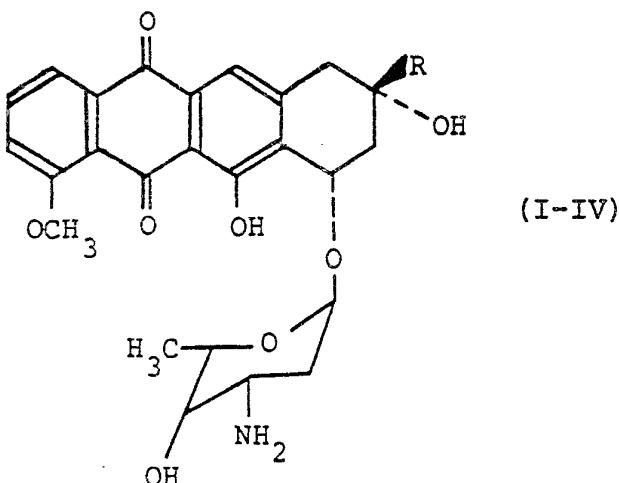
⑤4 Antibiotische Anthracyclinglycoside.

⑤7 Es werden Anthracyclinglycosidantibiotika mit der Formel I-IV, worin R = -CO-CH₂OH, -CHOH-CH₃, -CO-CH₃ oder -CH₂CH₃ bedeutet, beschrieben. Ihre Herstellung beruht auf der Fermentation mit dem Mikroorganismus *Micromonospora peucetica* sp. nova ATCC 31366. Die Anthracyclinglycoside zeigen Antitumor- und antibakterielle Wirksamkeit.



PATENTANSPRÜCHE

1. Antibiotische Verbindungen der Formel



worin R-CO-CH₂-OH, -CH(OH)-CH₃, -COCH₃ oder -C₂H₅ bedeutet, oder ein nichttoxisches pharmazeutisch verwendbares Säureadditionssalz davon.

2. 11-Deoxydoxorubicin der Formel I, worin R die Bedeutung CO-CH₂-OH hat oder ein nichttoxisches pharmazeutisch verwendbares Säureadditionssalz davon, als Verbindung gemäss Anspruch 1.

3. 11-Deoxy-13-dihydro-daunorubicin der Formel II, worin R die Bedeutung -CH(OH)-CH₃ hat oder ein nichttoxisches pharmazeutisch verwendbares Säureadditionssalz davon, als Verbindung gemäss Anspruch 1.

4. 11-Deoxydaunorubicin der Formel III, worin R die Bedeutung CO-CH₃ hat oder ein nichttoxisches pharmazeutisch verwendbares Säureadditionssalz davon, als Verbindung gemäss Anspruch 1.

5. 11-Deoxy-13-deoxodaunorubicin der Formel IV, worin R die Bedeutung -C₂H₅ hat oder ein nichttoxisches pharmazeutisch verwendbares Säureadditionssalz davon, als Verbindung gemäss Anspruch 1.

6. Mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von antibiotischen Verbindungen der Formel I-IV gemäss Anspruch 1, worin R die im Patentanspruch 1 angegebene Bedeutung hat, dadurch gekennzeichnet, dass man den Mikroorganismus Micromonospora peucetica sp. nova ATCC 31366 unter aeroben Bedingungen in einem wässrigen Kulturmedium, das eine assimilierbare Kohlenstoffquelle, eine assimilierbare Stickstoffquelle und Mineralsalze enthält, kultiviert.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man bei einer Temperatur von 25 bis 37°C bis 30 Tage lang und bei einem pH-Wert von zuerst 6,5 bis 7,0 und am Ende der Fermentation von 6,5 bis 8,0 arbeitet.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass man die antibiotischen Verbindungen der Formel I-IV, worin R die im Anspruch 1 genannte Bedeutung hat, aus der Fermentationsmasse, dem abgetrennten Mycel oder der filtrierten Brühe extrahiert.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass man die antibiotischen Verbindungen der Formel I-IV, worin R die im Anspruch 1 genannte Bedeutung hat, durch Säulenchromatographie auf Silikagel in dessen vier Anthracyclglycosidkomponenten, nämlich die Glycoside A, worin R = -CO-CH₂-OH; B, worin R = CH(OH)-CH₃; C, worin R = CO-CH₃, und D, worin R = C₂H₅ bedeutet, trennt.

10. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine oder mehrere antibiotische Substanzen

gemäss Anspruch 1 in Mischung mit einem pharmazeutisch verwendbaren Träger enthält.

5

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf neue Anthracyclglycosidantibiotika, die im folgenden als «Glycoside A, B, C und D» bezeichnet werden, sowohl als rohe Konzentrate in verdünnter Form als auch in reiner kristalliner Form.

Die Erfindung bezieht sich weiterhin auf die Herstellung dieser Verbindungen durch Fermentation eines Mutantenstammes von *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, deren

Gewinnung, Konzentration, Reinigung und Salzherstellung.

15 Die neuen Anthracyclglycoside zeigen Antitumor- und antibakterielle Wirksamkeit. Insbesondere sind die Glycoside A und C als Antitumormittel bei Versuchstieren verwendbar.

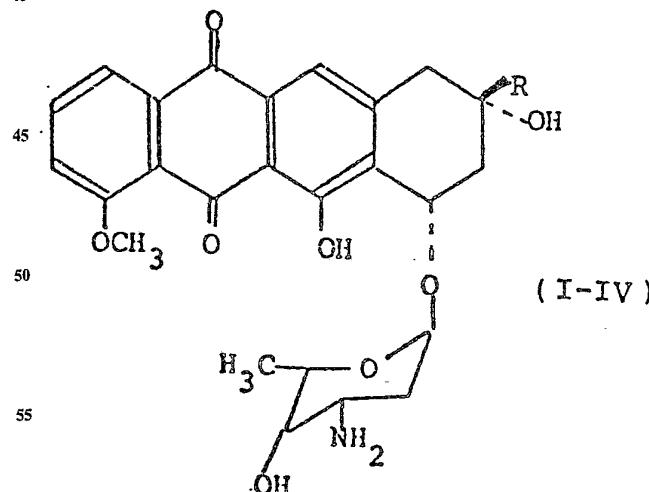
Der erfindungsgemäss verwendete Mikroorganismus wird 20 durch mutagene Behandlung von *Streptomyces peucetius* var. *caesius* mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitosoguanidin erhalten (Arcamone et al., Biotechnol. Bioengen., 1969, XI, 1101-1110). Dem neuen Stamm wurde die Code-Nummer B211 F.I. der Farmitalia Collection of Microorganisms

25 gegeben und er wurde bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen unter der Nummer 1190 DMS, bei der American Type Culture Collection, 12301 Park Lawn Drive, Rockville-Maryland 20852 (USA) unter der Nr. 31366 ATCC (Hinterlegungstag 27. Januar 1978) und beim Fermentation

30 Research Institute (Japan) unter der Nr. 4363 FRI hinterlegt. Wie bei vielen Antibiotika produzierenden Kulturen führt die Fermentation des Stammes B211 F.I. zur Bildung einer Mischung, welche die erfindungsgemässen antibiotischen Verbindungen der untenstehenden Formel I-IV enthält. Vier

35 biaktive Anthracyclinbestandteile, die Glycoside A, B, C und D, wurden isoliert.

Es wurde festgestellt, dass die erfindungsgemässen antibiotischen Verbindungen, welche die Glycoside A, B, C und D umfassen die folgende Formel aufweisen:



- 60 I: Glycosid A, R = -CO-CH₂OH
 II: Glycosid B, R = -CHOH-CH₃
 III: Glycosid C, R = -CO-CH₃
 IV: Glycosid D, R = -CH₂-CH₃, die
 65 11-Deoxy-adriamycin für Glycosid A (I),
 11-Deoxy-13-dihydro-daunomycin für Glycosid B (II),
 11-Deoxy-daunomycin für Glycosid C (III) und
 11-Deoxy-13-deoxodaunomycin für Glycosid D (IV)
 entsprechen.

Daunomycin und Adriamycin sind eigene Markennamen und werden hier für Daunorubicin bzw. Doxorubicin verwendet.

Die obigen Anthracyclinglycoside enthalten alle Daunosamin (3-Amino-2, 3, 6-trideoxy-L-lyxo-hexose), die Aminozuckerkomponente von Daunomycin und Adriamycin (F. Arcamone, G. Cassinelli, P. Orezzi, G. Franceschi und R. Mondelli, J. Am. Chem. Soc., 86, 5335, 1964, und eigene US-PS 590 028). Die Strukturen werden durch Analyse ihrer IR-, UV-, sichtbaren, Masse- und NMR-Spektren bestimmt und stimmen mit den im nachstehenden angegebenen chemischen und physikalischen Daten überein.

Die neuen Anthracyclinglycosidverbindungen bilden sowohl mit Säuren als auch mit Basen Salze und pharmazeutisch verwendbare Salze des Komplexes und seiner Bestandteile fallen unter den Rahmen der vorliegenden Erfindung. Beispiele derartiger pharmazeutisch verwendbarer Salze sind Salze mit Säuren, wie Salz-, Schwefel-, Stickstoff- und Phosphorsäure, und mit Metallkationen, z.B. Alkalimetall- oder Erdalkalimetallkationen, wie Natrium, Kalium, Kalzium und Magnesium, und auch mit anderen Kationen, wie dreiwertige Eisenkationen.

Der Mikroorganismus:

Mikroskopische Eigenschaften des Stammes B 211 F.I.

Sporen weisen folgende Grösse auf: $0,9\text{--}1,1 \times 1,1\text{--}1,6 \mu\text{m}$. Sie werden einzeln oder sehr häufig als Paare gebildet, selten als Büschel, endständig auf kurzen Sporophoren, die monopodial als Äste an langen, willkürlich gebildeten Hyphen mit einer Dicke von 0,5 bis 0,9 μm entstehen. Selten werden sessile Sporen beobachtet. Es werden keine polymorphen Formen gebildet. Luftmycel ist nicht vorhanden.

Makroskopische Eigenschaften des Stammes B 211 F.I.

Die Kultureigenschaften des Stammes B 211 F.I. sind in

Tabelle I angegeben. Das Wachstum ist im allgemeinen auf organischen Medien gut und auf synthetischen Medien weniger gut; auf ersteren ist es im allgemeinen erhaben und gefurcht und im Aussehen feucht, aber nicht schleimig.

Die Sporulationsschicht ändert das orange-terrakottafarbene vegetative Mycel bei Altern auf braun bis fast schwarz. Im allgemeinen wird kein lösliches Pigment gebildet. Bei Temperaturen über 40°C wird kein Wachstum festgestellt. Die physiologischen und biochemischen Eigenschaften des Stammes B 211 F.I. sind in Tabelle II angegeben.

Identifizierung und Klassifizierung des Stammes B 211 F.I.

Der Stamm B 211 F.I. ist klar auf den Genus *Micromonospora* Ørskov (Ørskov J. «Investigations into the Morphology of the Ray Fungi», Levin und Maunksgaard, Kopenhagen, 1923, S. 171) der Reihe Actinomycetales zurückzuführen, u.zw. auf Grund seiner morphologischen und Kulturgeigenarten. Jedoch ermöglichte eine sorgfältige vergleichende Prüfung der von Waksman S.A. («The Actinomycetes» Bd. 2, 1961, Williams und Wilkins Co., Baltimore, und «The Actinomycetes a Summary of Current Knowledge», 1967, Ronald Press Co.), Luedemann und Brodsky (1963) und Luedemann G. («Micromonospora Taxonomy» Advances in Applied Microbiology», 1970, 11, 101-133) für bekannte Arten, die diesem Genus angehören, beschriebenen und angegebenen Eigenschaften mit jenen, die der Stamm B 211 F.I. zeigt, keine Identifizierung dieses Stammes mit irgendeiner der genannten Species, die für den obgenannten Genus angeführt sind. Wegen seiner speziellen Carbohydratverwertung und im Hinblick auf die Tatsache, dass er neue Anthracycline produziert, kann geschlossen werden, dass der Stamm B 211 F.I. sich von allen bisher beschriebenen Species dieses Genus unterscheidet und eine neue Species ist. Der Name *Micromonospora peucetica* sp. nova wurde diesem Stamm gegeben.

Tabelle I
Kultureigenschaften des Stammes B 211 F.I. auf verschiedenen Medien gemäss Waksman, 1961, supra, wenn nicht anders angegeben.

Medium	Reaktion
Bennett's-Agar	Wachstum gut, erhöht und gefurcht; orange bis terrakotta oder korallenrot, wird beim Altern schwarz
Emerson's-Agar	Wachstum schön, erhöht und gefurcht; durchgehend hell-terrakotta, wird beim Altern braun
Glucose-Asparagin-Agar	Wachstum gut, flach; durchgehend hell-terrakotta
1% NZ-Amin Typ A, 1% Glucose + Agar (Luedemann, G. M. et al., Antimicrobial Agents, 1963, s. 116-124)	Wachstum gut, erhöht und gefurcht; orange-terrakotta bis hellrot, wird beim Altern braun bis schwarz
Glucose-Hefeextraktagar	Wachstum schlecht, erhöht und gefurcht; durchgehend hell-terrakotta
Stärke-Caseinagar	Wachstum gut, flach; durchgehend terrakotta
Gelatineagar	Wachstum schlecht, erhöht und gefurcht; terrakotta bis hellrot
Tyrosinagar (Gordon R. D. und Smith M. L., J. Bacteriol. 69, 1955, S. 147-150)	Wachstum gut, erhöht und gefurcht; zuerst hell-terrakotta, dunkel-rötlich, wird beim Altern kupferbraun bis fast schwarz; ein dunkelbraunes lösliches Pigment wird gebildet
Hefeextrakt-L-Tyrosinagar	Wachstum ziemlich flach; braun; ein dunkelrötliches Pigment wird gebildet
Pepton-Eisenagar (Tresner H. D. und Danga F., J. Bacteriol. 76, 1958, S. 239-244)	Wachstum gut, erhöht und gefurcht; durchgehend hell-terrakotta
Kartoffel-Glucoseagar	Wachstum mässig, erhöht und gefurcht; terrakotta bis braun, wird beim Altern fast schwarz
Czaplicki-Agar	Wachstum gering, flach; hell-terrakotta, wird beim Altern schwarz
Glycerin-Glycinagar	Wachstum mässig, flach; zuerst farblos, wird beim Altern olivgrün bis dunkelgrün
Anorganische Salze-Stärkeagar (Pridham T. C. et. al., Antibiotics Annual 1956/1957, S. 947-953)	Wachstum schön, flach; rosa bis terrakotta, wird beim Altern orangebraun
Glycerin-Asparagin-Agar	Wachstum gering, flach; hell-terrakotta, wird beim Altern fast schwarz
SA-Agar (bezüglich Zusammensetzung siehe Aufrechterhaltungsmedium in Beispiel 1)	Wachstum gut, erhöht und gefurcht; zuerst crèmefarben bis honigfarben, wird später terrakotta und beim Altern leicht bräunlich; manchmal wird ein gelbes lösliches Pigment festgestellt, das beim Altern hellbraun wird

Tabelle II

Physiologische und biochemische Eigenschaften des Stammes B 211 F. I.*

Verwertung von:	Glucose	+
Verwertung von:	Saccharose	+
Verwertung von:	D-Xylose	+
Verwertung von:	M-Mannit	+
Verwertung von:	M-Inositol	+
Verwertung von:	L-Arabinose	+
Verwertung von:	D-Fructose	+
Verwertung von:	Adonit	+
Verwertung von:	Lactose	+
Verwertung von:	d(+)-Mannose	+
Verwertung von:	Maltose	+
Verwertung von:	Raffinose	+
Verwertung von:	L-Rhamnose	+
Verwertung von:	α - α -Trehalose	+
Verwertung von:	Äsculin	+
Verwertung von:	Glycerin	+
Verwertung von:	Na-Citrat	+
Verwertung von:	NH ₄ -Succinat	+
Verwertung von:	Na-Aacetat	+
Verwertung von:	NH ₄ -Tartrat	+
Verwertung von:	Glycogen	-
Verwertung von:	Paraffin	-
Negative Kontrolle:		
Verflüssigung von Gelatine		+
Tyrosinersetzung		+
Malaninbildung		+
Stärkehydrolyse		+
H ₂ S-Bildung		-
Nitratreduktion		+
Milch (Pepton und Koag.) gebildete Antibiotika: neue Anthracycline		

+ = positive Reaktion

- = negative Reaktion

* Das Medium für den Carbohydratverwertungstest wurde von R. D. Gordon und M. L. Smith, supra, beschrieben; die für die anderen physiologischen Reaktionen verwendeten Medien sind von S. A. Waksman, 1961, supra, angegeben.

Fermentierungsverfahren

Die Produktion wird durch übliche, wohlbekannte Methoden durchgeführt und besteht im Kultivieren des Mikroorganismus in einem vorher sterilisierten flüssigen Kulturmedium unter aeroben Bedingungen in der Regel bei einer Temperatur von 25 bis 37°C (vorzugsweise bei 28°C) während 5 bis 30 Tagen (vorzugsweise 15 Tagen) und bei einem pH-Wert von zunächst 6,5 bis 7,0 und am Ende der Fermentation von 6,5 bis 8,0.

Das Kulturmedium besteht aus einer Kohlenstoff- und einer Stickstoffquelle sowie aus Mineralsalzen. Die Kohlenstoffquelle kann beispielsweise Stärke, Dextrin, Glucose, Glycerin, Mannit, Maltose, Getreideweiche, Trebern, Sojabohnenöl oder Sojabohnenmehl sein. Die Stickstoffquelle kann außer den oben erwähnten komplexen Substanzen, die Stickstoff enthalten, beispielsweise Trockenhefe, Fleischpepton oder Casein sein. Gute Ergebnisse werden sogar durch Verwendung von Ammoniumsalzen, wie Ammoniumnitrat, Ammoniumsulfaten, Diammoniumphosphaten, erhalten. Die Mineralsalze variieren entsprechend dem verwendeten Medium. In einem Medium, das komplexe Substanzen, wie verschiedene Mehle und Fermentationsrückstände, enthält, hat sich der Zusatz von Kalziumcarbonat und Natrium- oder Kaliumphosphaten als zweckmäßig erwiesen. In Medien, die Glucose oder Ammoniumsalze enthalten, sind wesentlich höhere Mengen an Mineralsalzen, wie

Kalium-, Natrium- oder Kalziumsalzen, und Zusätze von Spurenelementen, wie Eisen, Zink, Kupfer, Magnesium und Mangan, notwendig. Die Fermentation kann in Erlenmeyer-Kolben oder in Laboratoriums- oder Industriefermentern mit 5 verschiedenen Fassungsvermögen durchgeführt werden.

Analytische Methoden

Proben der Fermentationsbrühen und der rohen Zubereitungen werden unter Verwendung von Whatman Nr.

- 10 1-Papier, gepuffert mit M/15 Phosphatpuffer auf pH 5,4, Papierchromatographie unterworfen, wobei als Eluierungsmittel eine Mischung von n-Propanol: Äthylacetat: Wasser (7:1:2) verwendet wird. Die Papierstreifen werden einer Bioautographie gegen *Bacillus subtilis* unterworfen und es 15 wurde gefunden, dass vier antibiotische Substanzen auftreten. Diese werden als Glycosid A (Rf 0,30), B (Rf 0,50), C (Rf 0,55) und D (Rf 0,65) bezeichnet.

Rohe Zubereitungen werden unter Verwendung von vorher überzogenen TLC-Platten aus Silikagel 60-F-254

- 20 (Merck) Dünnschichtchromatographie (TLC) unterworfen, wobei als Eluierungsmittel eine Mischung aus Chloroform: Methanol: Essigsäure: Wasser (80:20:14:6) verwendet wird. Es treten vier gelbe Verbindungen auf, die Glycosid A (Rf 0,50), B (Rf 0,55), C (Rf 0,65) bzw. D (Rf 0,70) entsprechen.

25 Eine quantitative Bestimmung der gesamten, in den Fermentationsbrühen vorhandenen gelben Bestandteile kann wie folgt durchgeführt werden. Zu einer Probe der Brühe, auf pH 8,6 eingestellt, werden zwei Volumina Chloroform: Methanol (9:1) zugesetzt. Die erhaltene Mischung wird 1 min bei

- 30 R.T. beschallt. An einer Probe der organischen Phase, die mit saurem Methanol verdünnt ist, kann der Gesamtgehalt der gelben Anthracycline und deren Aglycone spektrophotometrisch bei 418 nm bestimmt werden. An einer Probe der organischen Phase, die unter verminderter Druck konzentriert

35 wurde, kann die quantitative Bestimmung der einzelnen Glycoside durch präparative TLC unter Verwendung des oben angegebenen Systems erhalten werden. Die verschiedenen gelben Zonen werden abgekratzt und mit Methanol eluiert. Jeder Bestandteil wird spektrophotometrisch bei 418 nm

- 40 bestimmt. Glycosid A ist in den Fermentationsbrühen gewöhnlich der Hauptbestandteil.

Isolierverfahren

Nach der Fermentation sind die aktiven Verbindungen in 45 den Mycelien und in der Fermentationsflüssigkeit enthalten.

Der antibiotische Anthracyclinkomplex kann bei pH 8,5 bis 9,0 in Form freier Basen aus der Kulturbrühe «insgesamt» mit einem mit Wasser nicht-mischbaren organischen Lösungsmittel, wie Butanol, Methylisobutylketon, Chloroform, Methylendichlorid oder Äthylacetat, extrahiert werden. Vorzugsweise werden die Mycele und die Fermentationsflüssigkeit durch Filtrieren bei pH 4 mit Hilfe von Diatomeenerde getrennt und dann getrennt extrahiert.

Der Filtrationskuchen wird mit einer Mischung eines in 55 Wasser löslichen Lösungsmittels, wie Aceton, Methanol oder einem anderen nied. Alkohol, und einer wässrigen 0,1N Lösung einer anorganischen oder organischen Säure, wie Salzsäure, Schwefelsäure oder Essigsäure, extrahiert. Im allgemeinen wird eine Mischung aus Aceton:0,1N Salzsäure im

60 Verhältnis 4:1, bezogen auf das Volumen, verwendet. Die Mycelextrakte werden gesammelt, auf einen pH-Wert von 4 eingestellt und dann unter verminderter Druck eingeengt. Das wässrige Konzentrat wird mit der filtrierten Brühe vereinigt, auf einen pH-Wert von 8,5 bis 9,0 eingestellt und dann 65 mit einem mit Wasser nicht-mischbaren organischen

Lösungsmittel, vorzugsweise Chloroform oder n-Butanol, extrahiert. Die Extrakte werden unter verminderter Druck eingeengt und der Anthracyclinkomplex wird durch Zusetzen

von 5 Volumina n-Hexan ausgefällt. Die Bestandteile des rohen Komplexes werden dann fraktioniert und durch Säulenchromatographie gereinigt.

Reinigungsverfahren

Die weitere Reinigung des antibiotischen Komplexes und dessen Trennung in die vier Bestandteile kann durch Säulenchromatographie mit Silikagel bewirkt werden. Das rohe orange-braune Pulver wird in Chloroform gelöst und die Lösung, gemischt mit 1 Äquivalent methanolischem Chlorwasserstoff, auf Silikagel mit Mischungen aus Chloroform, Methanol und Wasser chromatographiert. Die Bestandteile D und C werden zuerst mit einer 94,8:5,0:0,2-Mischung eluiert. Die Glycoside B und A folgen mit einer 89,5:10:0,5-Mischung. Die Komponenten werden gewöhnlich getrennt, wie durch Papier- und Dünschichtchromatographie gezeigt, und die vier Bestandteile werden als Hydrochloride in kristalliner Form erhalten.

Chemische und physikalische Eigenschaften

Die neuen Antibiotika der vorliegenden Erfindung

besitzen einige gemeinsame Eigenschaften, doch können sie auf Grund ihrer chemischen und physikalischen Merkmale unterschieden werden. Alle neuen Anthracycline besitzen eine vergleichbare Löslichkeit; als freie Basen sind sie in

- 5 Chloroform, Methylendichlorid, Aceton, Methanol, Äthan, wässrigen Alkoholen, saurem Wasser, Dioxan und Pyridin löslich, aber wenig löslich oder unlöslich in Diäthyläther, n-Hexan, Cyclohexan und Petroläther; als Hydrochloride sind sie in Wasser, Methanol, Äthan und wässrigen
- 10 Alkoholen löslich, aber unlöslich in Aceton, Benzol, Chloroform, Diäthyläther und Petroläther. Sie können als Indikatoren, die in neutralen und sauren Lösungen orange-gelb sind und in welchen sie auch unter UV-Licht orange-rote Fluoreszenz zeigen, verwendet werden. Ihre alkalischen Lösungen
- 15 sind rotbraun und, wenn sie mit alkoholischem Magnesiumacetat behandelt werden, ergeben sie rote Lösungen.

All diese Eigenschaften und die Absorptionsspektren in den UV- und sichtbaren Zonen zeigen, dass diese neuen Verbindungen zu der Gruppe der Anthracyclinantibiotika gehören.

- 20 Die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Glycoside A, B, C und D, als Hydrochloride isoliert, sind in Tabelle III angegeben.

Tabelle III

Eigenschaft	Glycosid A. HCl	Glycosid B. HCl	Glycosid C.HCl	Glycosid D.HCl				
Fp. [α] _D ²³ (c = 0,2 in Methanol)	171–173°C (Zers.) +111°	163–164°C (Zers.) +107°	175–176°C (Zers.) +139°	140–150°C (Zers.) +122°				
UV- und sichtbare Spektren								
$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$	228,260,418 nm	228,260,418 nm	228,260,418 nm	228,260,418 nm				
$E_{1\text{cm}}^{1\%}$	645,420,193	640,410,179	713,450,199	610,395,171				
$\lambda_{\text{max}}^{\text{pH}7\text{-Puffer}}$	235,262,426 nm	235,262,426 nm	235,262,426 nm	235,262,426 nm				
$E_{1\text{cm}}^{1\%}$	600,406,161	605,400,160	617,424,166	580,400,160				
$\lambda_{\text{max}}^{0,01\text{N NaOH}}$	510 nm	510 nm	510 nm	510 nm				
$E_{1\text{cm}}^{1\%}$	120	118	128	110				
IR-Spektrum (KBr): cm ⁻¹	3700–2400 1725 1670 1625 1585 1490 1470 1450 1420 1385 1330 1300 1290 1240	1200 1180 1115 1085 1055 1015 985 940 875 840 820 795 755 440	3700–2400 1665 1625 1585 1485 1470 1445 1420 1385 1325 1290 1235	1195 1180 1115 1050 1010 985 940 840 820 750 435	3700–2300 1710 1670 1625 1585 1490 1470 1445 1420 1420 1385 1325 1295	1195 1115 1085 1010 985 835 815 795 750 435	3700–2400 1665 1625 1585 1485 1465 1445 1420 1385 1325 1295	1190 1180 1180 1040 1010 980 830 750 430
empirische Formel	C ₂₇ H ₂₉ NO ₁₀ .HCl	C ₂₇ H ₃₁ NO ₉ .HCl	C ₂₇ H ₂₉ NO ₉ .HCl	C ₂₇ H ₃₁ NO ₈ .HCl				
Molgewicht	564	550	548	534				

Diese neuen Anthracyclinantibiotika zeigen auch charakteristische NMR-Spektren. Das Spektrum von Glycosid A, als Hydrochlorid in DMSO-d₆, zeigte charakteristische Signale bei 1,14δ (d, CH₃–C–5'), 3,39δ (s, CH₃O), 4,60δ (breites s, C–14–H₂), 4,89δ (breites s, C–7–H), 5,27δ (breites s, C–1'-H), 7,23δ (s, C–11–H), 7,4–7,9δ (m, C–1–H, C–2–N und C–3–H) und 13,61δ (s, C–6–OH). Das Glycosid, als Hydrochlorid in DMSO-d₆, zeigte Signale bei 1,15δ (d, CH₃–C–5'), 2,26δ (s, CH₃CO), 3,92δ (s, CH₃O), 4,90δ (breites s, C–7–H), 5,26δ (breites s, C–1'-H), 7,31δ (s, C–11–H), 7,4–7,9δ (m, C–1–H, C–2–H und C–3–H) und 13,65δ (s, C–6–OH).

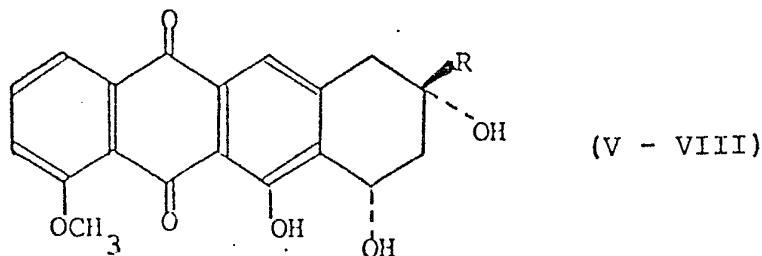
Felddesorptionsmassenspektroskopie der freien Basen von

Glycosid A, B, C und D bestätigten die zugeschriebenen Molekularformeln, wie in Tabelle IV gezeigt.

Tabelle IV

Verbindung	Molekularformel	ber.	gef.	m/e
Glycosid A	C ₂₇ H ₂₉ NO ₁₀	527	527	(M ⁺)
Glycosid B	C ₂₇ H ₃₁ NO ₉	513	514	(MH ⁺)
Glycosid C	C ₂₇ H ₂₉ NO ₉	511	512	(MH ⁺)
Glycosid D	C ₂₇ H ₃₁ NO ₈	497	498	(MH ⁺)

Wässrige Säurehydrolyse der Glycoside A, B, C und D ergab vier verschiedene wasserunlösliche gelbe Aglycone der Formeln V bis VIII. Die wässrigen löslichen Fraktionen enthielten denselben reduzierenden Aminozucker, der als Daunomycin (3-Amino-2,3,6-trideoxy-L-lyxohexose) identifiziert wurde, die Aminozuckerkomponente von Daunomycin und Adriamycin.



V: Aglycon A, R = COCH₂OH

VI: Aglycon B, R = CHOH-CH₃

VII: Aglycon C, R = COCH₃

VIII: Aglycon D, R = CH₂CH₃

Die Aglycone A, B, C und D sind neue Anthracyclinone, die 11-Deoxy-adriamycin für Aglycon A (V), 11-Deoxy-13-dihydro-daunomacino für Aglycon B (VI),

11-Deoxy-daunomycin für Aglycon C (VII) bzw. 11-Deoxy-13-deoxo-daunomycin für Aglycon D (VIII) entsprechen.

20 Die Strukturen der Aglycone wurden durch Analyse ihrer IR-, UV-, sichtbaren, Masse- und magnetischen Resonanzspektren bestimmt. Ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften gehen aus Tabelle V hervor.

Tabelle V

Eigenschaft	Aglycon A	Aglycon B	Aglycon C	Aglycon D
Fp. °C	220	175–180 (Zers.)	213–215	175–180 (Zers.)
[α] _D ²⁵ (c = 0,1)	+161° (Dioxan)		+144° (Methanol)	+164° (Methanol)
UV- u. sichtbare Spektren				
$\gamma_{\max}^{\text{MeOH}}$	227,259,418 nm	227,258,418 nm	227,258,418 nm	227,258,418 nm
$E_{1\text{cm}}^{1\%}$	895,640,268		930,660,317	990,640,280
empirische Formel	C ₂₁ H ₁₈ O ₈	C ₂₁ H ₂₀ O ₇	C ₂₁ H ₁₈ O ₇	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
Molgewicht				
berechnet	398	384	382	368
gefunden m/e	398 (M ⁺)	384 (M ⁺)	382 (M ⁺)	368 (M ⁺)

Biologische aktive Daten

a) Antibakterielle Wirksamkeit

Die «in vitro» minimalen Hemmungskonzentrationen (MIC) der Glycoside A, B, C und D wurden für bestimmte

Mikroorganismen unter Anwendung des Standardrohrverdünnungsverfahrens bestimmt und sind in Tabelle VI angegeben.

Tabelle VI

Testorganismus	MIC in µg/ml			
	Glycosid A (I)	B (II)	C (III)	D (IV)
Staphylococcus aureus 209 P	125	1000	62	250
Staphylococcus aureus 153	500	1000	250	1000
Sarcina lutea ATCC 9341	100	100	12,5	25
Bacillus subtilis ATCC 6633	100	100	50	100
Escherichia coli B	50	100	25	50

b) Antitumorwirksamkeit

Die neuen Verbindungen wurden gegen HeLa-Zellen in vitro (Zeit der Einwirkung der Heilmittel 24h) und auf L1210- und P 388-Leukämie an Mäusen im Vergleich mit Daunorubicin getestet. Die Ergebnisse der in vitro-Versuche gehen aus Tabelle VII hervor. Es kann festgestellt werden, dass alle Verbindungen, die Zellenentwicklungsähigkeit von HeLa-Zellen in vitro hemmten, wobei die ID₅₀ für Glycosid

C 0,05 µg/ml, für Glycosid A 0,1 µg/ml, für Glycosid D 0,22 µg/ml und für Glycosid B 0,44 µg/ml beträgt.

Die in vivo-Daten, die bei Mäusen erhalten wurden, sind in Tabelle VIII angegeben. Glycosid A war gegen P 388-Leukämie in einer Dosis von 66 mg/kg wirksam und bei der Dosis von 100 mg/kg toxisch; bei der tolerierten Dosis war die Antitumorwirksamkeit höher als jene von Daunorubicin.

Tabelle VII

Wirkung auf die Entwicklungsfähigkeit von HeLa-Zellen in vitro

Verbindung	Dosis* (ng/ml)	Anzahl von Kolonien** %	ID ₅₀ (ng/ml)
Daunorubicin (Daunomycin)	12,6	35-15	6-7
	6,25	48-66	
	3,12	71-80	
Glycosid A (I)	200	1	105
	100	63	
	50	73	
	25	74	
Glycosid C (III)	200	3	54
	100	44	
	50	54	
Glycosid D (IV)	400	0	220
	200	53	
	100	109	
Glycosid B (II)	1600	0	440
	800	20	
	400	66	

* HeLa-Zellen wurden den Heilmitteln 24 h lang ausgesetzt und dann plattiert.
Die Kolonienanzahl wurde 5 Tage später festgestellt.

** % gegenüber unbehandelten Kontrollen

F.I., wurde 25 Tage lang bei 28°C auf Schrägar mit dem Aufrechterhaltungsmedium SA gezüchtet. Das Medium SA hatte die folgende Zusammensetzung:

5	Glucose 3%, Brauerei-Trockenhefe	3%
	Natriumchlorid	1,2%
	Kaliumdihydrogenorthophosphat	0,05%
	Kalziumcarbonat	0,1%
10	Magnesiumsulfat	0,005%
	Ferrosulfatheptahydrat	0,0005%
	Zinksulfatheptahydrat	0,0005%
	Cuprisulfatpentahydrat	0,0005%
	Agar	2%
15	Leitungswasser bis zu	100%.
		Die Sterilisierung wurde durch Erhitzen in einem Autoklaven bei 120°C während 20 min bewirkt.
		Die Mycelmatte der so erhaltenen Kultur wurde abgekratzt
20	und in 3 ml steriles destillierten Wasser suspendiert. Die Suspension wurde in 300-ml-Erlenmeyerkolben mit einem Gehalt von 60 ml des folgenden flüssigen Wachstumsmediums angeimpft:	
25	Brauerei-Trockenhefe	0,3%
	Pepton	0,5%
	Kalziumnitrattetrahydrat	0,05%
	Leitungswasser bis zu	100%.

Tabelle VIII
Wirkung gegen P 388- und L 1210-Leukämie bei Mäusen

Verbindung	Dosis* (mg/kg)	T/C % L 1210	P 388	toxische Todesfälle**
Daunorubicin	2,9	133-133	199	14/26
	4,4	140-133	200	
	6,6	111-133	223	
Glycosid A (I)	2,9	111		1/10
	6,6	128		
	10	122		
	66		245	
Glycosid C (III)	100		254	3/8
	2,9	100		
	6,6	117		
	15	122		
Glycosid D (IV)	100		181	3/19
	150		45	
	2,9	100		
	6,6	100		
Glycosid B (II)	15	111		5/5
	125		18	
	250	0	9	
	2,9	100		
	6,6	122		
	15	122		5/5
	500		9	
			2/2	

* Mäuse wurden intraperitoneal einen Tag nach der Tumorzellenanimpfung behandelt.

** Die Bewertung erfolgte auf Grundlage der makroskopischen Autopsiuntersuchungen.

Die folgenden Beispiele sollen die vorliegende Erfindung näher erläutern, ohne dass diese jedoch hierauf beschränkt sein soll.

Beispiel 1
Eine Kultur von *Micromonospora peucetica*, Stamm B 211

30	Die Sterilisierung wurde durch Erhitzen in einem Autoklaven bei 120°C während 20 min bewirkt. Der pH-Wert des Mediums betrug nach der Sterilisierung 6,8 bis 7,0.
	Die angeimpften Kolben wurden 8 Tage lang bei einer Temperatur von 28°C auf einem Drehschüttler bei 250 UpM, der einen Kreis mit einem Durchmesser von 7 cm umschrieb, geschüttelt. 5 ml der wie oben gezüchteten Kultur wurden in einen 300-ml-Erlenmeyerkolben mit einem Gehalt an 50 ml des folgenden Produktionsmediums eingimpft:
35	Glucose 6% Brauerei-Trockenhefe 3% Natriumchlorid 0,2% Kaliumdihydrogenorthophosphat 0,1% Kalziumcarbonat 0,2% Magnesiumsulfat 0,01% Ferrosulfatheptahydrat 0,001% Zinksulfatheptahydrat 0,001% Cuprisulfatpentahydrat 0,001% Leitungswasser bis zu 100%.
40	Das Sterilisieren wurde durch Erhitzen im Autoklaven bei 115°C während 20 min bewirkt.
45	Die Kolben wurden 25 Tage lang bei 28°C unter Bedingungen bebrütet, die mit jenen für die Animpfphase identisch sind. Die maximale Konzentration der aktiven Verbindungen wurde zwischen dem 18. und 22. Tag der Fermentation mit einer Produktion von 90 mcg/ml erzielt.
50	

60

Beispiel 2

Eine Kultur des Stammes B 211 F.I. wurde 14 Tage lang, wie in Beispiel 1 beschrieben, gezüchtet und die Mycelmatte, die, wie in Beispiel 1 beschrieben, gesammelt wurde, wurde in 300 ml-Erlenmeyerkolben mit einem Gehalt an 50 ml des folgenden flüssigen Wachstumsmedium eingimpft:

lösliche Stärke	4%
Sojabohnenmehl	1,5%

Brauerei-Trockenhefe	0,5%
Getreideweiche	0,8%
Kalziumcarbonat	0,3%
Kaliummonohydrogenorthophosphat	0,05%
Magnesiumsulfat	0,025%
Kaliumchlorid	0,025%
Leitungswasser bis zu	100%.

Der pH-Wert von 5,7 wurde vor der Sterilisierung mit Natriumhydroxy auf 7,5 erhöht. Die Sterilisierung wurde bei 120°C während 20 min bewirkt.

Nach 4 Tagen Bebrütung unter den in Beispiel 1 beschriebenen Bedingungen wurden 5 ml der so gezüchteten Kultur in 300 ml-Erlenmeyerkolben mit einem Gehalt an 50 ml des oben beschriebenen Mediums eingepfist.

Dann wurden die Kolben unter den gleichen Bedingungen, wie oben beschrieben, 10 Tage lang bebrütet. Die maximalen Konzentrationen der aktiven Verbindungen wurden zwischen dem 8. und 9. Tag der Fermentation mit einer Produktion von 15 mcg/ml erzielt.

Beispiel 3

Das gesamte Bier (20 l) aus einer gemäss Beispiel 1 erhaltenen Fermentation wurde mit Salzsäure auf einen pH-Wert von etwa 4 eingestellt und unter Verwendung von 3% Diatomeenerde als Filterhilfe filtriert, wobei ein Kuchen und ein Filtrat erhalten wurden, die getrennt extrahiert wurden. Der nasse Filterkuchen wurde mit etwa 4 l einer Mischung aus Aceton und 0,1N wässriger Salzsäure (80:20) behandelt. Nach Filtration gewährleistete eine zweite Behandlung mit weiteren 3 l angesäuertem Aceton die vollständige Extraktion der aktiven Verbindungen. Die kombinierten wässrigen Acetonextrakte wurden mit Ammoniumhydroxyd auf einen pH-Wert von etwa 4 eingestellt, unter vermindertem Druck auf etwa 1 l eingeengt und mit der filtrierten Brühe vereinigt. Die erhaltene Mischung wurde auf einen pH-Wert von etwa 8,5 bis 9,0 eingestellt und dann zweimal mit einem halben Volumen einer Chloroform-Methanol (9:1)-Mischung extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Wasser gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck auf ein Volumen

von etwa 200 ml eingeengt. Durch Zusetzen 1 l n-Hexans fiel der rohe Komplex als gelb-braunes Pulver (7 g) aus.

Beispiel 4

- 5 Eine Chloroformlösung des rohen Komplexes als freie Base (6 g in 200 ml) wurde nach Behandlung mit 10 ml 1N methanolischen Chlorwasserstoffs auf eine Kieselsäuresäule (hergestellt in Chloroform) aufgebracht. Die Säule wurde mit Chloroform gewaschen, worauf mit einer Mischung aus 10 Chloroform, Methanol, Wasser (94,8:5:0,2) eluiert wurde. Die erste gelbe Fraktion enthielt einige Aglycone, die nächsten zwei gelbe Banden enthielten das Glycosid D bzw. C. Die Eluierung wurde mit einer Mischung aus Chloroform, Methanol, Wasser (89,5:10:0,5) fortgesetzt, bis zwei andere 15 gelbe Banden, entsprechend den Glycosiden B und A, eluiert wurden. Die Fraktionen, die diese vier Banden enthielten, wurden getrennt unter vermindertem Druck konzentriert, wobei die praktisch reinen Hydrochloride von Glycosid D (0,2 g), Glycosid C (0,4 g), Glycosid B (0,2 g) und Glycosid A 20 (0,6 g) als mikrokristalline Pulver erhalten wurden. Durch Umkristallisieren der Glycoside A und C aus Methanol: n-Butanol wurden die entsprechenden reinen Hydrochloride als gelb-orangefarbene Kristalle erhalten, Fp. 171–173°C mit Zersetzung für Glycosid A, Fp. 163–164°C mit Zersetzung für 25 Glycosid B, Fp. 175–176°C mit Zersetzung für Glycosid C und Fp. 140–150°C mit Zersetzung für Glycosid D.

Herstellung des Aglycons A

Eine 250-mg-Probe von Glycosid A wurde in 10 ml 0,2N 30 wässriger Salzsäure gelöst und die Lösung wurde 1 h auf 95°C erhitzt. Ein kristalliner gelb-orangefarbener Niederschlag wurde nach Kühlung durch Filtration gesammelt, mit Wasser gewaschen und über Phosphorpentoxid über Nacht unter Vakuum getrocknet. Es wurden 170 mg Aglycon A in 35 reiner Form erhalten, Fp. 220°C, m/e: 398 (M^+). Nach der Ausfällung des Aglycons wurde die fast farblose wässrige saure Lösung mit einem Anionenaustauscherharz auf pH 5 eingestellt und dann gefriergetrocknet. Der Rückstand (60 mg), aus Methanol: Aceton kristallisiert, ergab eine kristalline Verbindung, Fp. 166°C (Zers.), die durch direkten Vergleich mit einer authentischen Probe als Daunosamin identifiziert wurde.